斜纹夜蛾普通气味结合蛋白 GOBP1 基因的表达定位分析

吴仲南[1], 杜永均[1,*], 诸葛启钏[1,2]

(1. 温州医学院健康与环境生态研究所,浙江温州 325035; 2. 温州医学院附属第一医院神经外科,浙江温州 325000)

摘要: 气味调控斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*(鳞翅目,夜蛾科)的交配和产卵行为,而嗅觉气味结合蛋白(OBP)是昆虫与外界环境进行化学信息交流中的一种重要蛋白。本研究基于已报道的斜纹夜蛾普通气味结合蛋白 GOBP1 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号为 EF159978)设计引物,通过 RT-PCR 法分析了 GOBP1 mRNA 的组织特异性表达情况,并对 GOBP1 基因条带进行了克隆、测序和 Blast 比对。此外,再通过 RNA 原位杂交的方法进一步分析了 GOBP1 mRNA 在触角中的表达定位。结果表明:GOBP1 只在斜纹夜蛾的触角组织中表达,而且 GOBP1 转录本较多分布于靠近嗅觉感受器即触角边缘部位。这些结果进一步说明 GOBP1 是斜纹夜蛾嗅觉过程中的重要蛋白,同时为深入研究 GOBP1 与其他蛋白的相互空间定位关系、GOBP1 的功能等奠定了基础。

关键词: 斜纹夜蛾; 普通气味结合蛋白; 基因表达定位; 原位杂交

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2009)06-0610-07

Expression and localization analysis of general odorant binding protein 1 (GOBP1) gene in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)

WU Zhong-Nan[1], DU Yong-Jun[1,*], ZHUGE Qi-Chuan[2] (1. Institute of Health & Environment, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325035, China; 2. Department of Neurosurgery, 1st Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

Abstract: Odor chemically mediates *Spodoptera litura* (Lepidoptera, Noctuidae) mating and oviposition behaviors, and odorant-binding protein (OBP) on the moth antenna is one of the important kinds of proteins involved in chemical communication with the environment. In this study the primers were designed according to the sequence of *S. litura* GOBP1 (GenBank accession no. EF159978) reported before, and the tissue expression pattern of GOBP1 in the moth was analyzed by using RT-PCR technology. The results showed that GOBP1 is an antennal-specific protein and expresses only in the antennae of *S. litura*. The fragments of GOBP1 gene were also cloned, sequenced and blasted against GenBank. The further experiments of localization of GOBP1's mRNA by *in situ* hybridization methods revealed that the GOBP1 specifically express in the tissue of moth antenna, and their transcripts were more widely distributed in the cells bordering of the antennal surfaces where the chemosensory hairs are located. The results suggest that GOBP1 plays crucial roles in moth olfaction recognition. Our findings provide the basis for the further study on the function of GOBP1 and its interaction with spatial localization of other proteins.

Key words: *Spodoptera litura*; general odorant binding protein (GOBP); localization of gene expression; *in situ* hybridization

嗅觉在昆虫的生存和繁衍中至关重要(Field *et al.*, 2000),昆虫通过分布于触角(少数为下唇须)表层的嗅觉感受器来获取环境中的化学信息,进而调控其觅食、聚集、求偶和寻找产卵场所等重要行为。嗅觉气味结合蛋白(odorant-binding proteins, OBPs)是溶解于嗅觉感受器淋巴液的一类分泌性蛋白,能运输气味分子到达嗅觉神经元表面的嗅觉受体,是昆虫专一性识别外界气味物质的第一步生化反应(Vogt and Riddiford, 1981),对于昆虫与外界进行信息交流具有重要意义(Li and Prestwich,

基金项目: 浙江省自然科学基金重大项目(D3080388)

作者简介: 吴仲南,女,1981 年 10 月生,浙江东阳人,硕士,从事昆虫嗅觉机理研究,E-mail:wzn@wzmc.net

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: dyj@wzmc.net

收稿日期 Received: 2008-12-22; 接受日期 Accepted: 2009-04-02

1997)。深入研究 OBPs 不仅具有阐明昆虫嗅觉识别的理论意义,而且也有为开发新型有效的生物害虫防治技术提供新思路的实际意义。目前一般将昆虫 OBPs 分为性信息素结合蛋白(pheromone binding protein,PBP)和普通气味结合蛋白(general odorant binding protein,GOBP),后者又可分为 GOBP1 和 GOBP2(Steinbrech *et al*., 1995; Krieger and Breer, 1999; Konstanopoulou *et al*., 2006; Wang *et al*., 2007)。PBP 主要存在于雄蛾触角中,位于对性信息素敏感的毛形感受器中,因此它们与昆虫感受性信息素有关。GOBP1 和 GOBP2 在雌雄触角中都有表达且各自的雌雄表达量差异不大,它们与对植物气味敏感的锥形感器相关。

不同于气味受体,OBP 在不同物种中的序列同源性较高,寻找新物种中的 OBP 相对比较容易,鳞翅目、双翅目、膜翅目和直翅目等多种昆虫中的 OBPs 基因序列已在 GenBank 中登录。果蝇中被鉴定的 OBP 家族包含 35 个成员,有些甚至报道有 50 个(Vogt, 2005)。OBP 的一级序列和三维结构已被鉴定,并已提出了它们之间的结合机制(Kruse *et al*., 2003; Wojtasek and Leal, 2005),但对 OBP 的功能研究在果蝇中开展较少,很多都在蛾类中进行。研究发现 OBP 在决定受体活化时程和气味分子失活中起作用,有关实验目前大部分在蛾类中进行(Maida *et al*., 2000, 2003)。近年来国内对 OBPs 的研究也日益增多,如对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*(王桂荣等,2001)、烟青虫 *Helicoverpa assulta*(巩中军等,2005)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*(李正西和 Zhou, 2004)等的 OBPs 的鉴定和序列克隆分析,但都局限于对其 cDNA 的克隆和序列分析及系统发育树进化分析工作上。

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*,属鳞翅目(Lepidoptera),夜蛾科(Noctuidae),杂食性昆虫,寄主植物包括 44 科 112 种,是我国长江以南农作物的重要害虫之一(谢建军等,1999)。近年来,对斜纹夜蛾嗅觉的研究日益被重视,钟国华等(2008)鉴定了斜纹夜蛾的 GOBP1 cDNA 序列;Xiu 等(2008)鉴定了斜纹夜蛾信息结合蛋白(pheromohe binding proteins, PBPs)的 cDNA 序列,并对 PBPs 基因的 RNA 表达和蛋白表达组织特异性进行了分析。对于斜纹夜中的这些 OBP 在触角感受器中的具体定位和分布,都未进行相关研究,而 OBP 在触角感受器淋巴液中的分布情况与 OBP 的功能有密切关系。常用的 Western blot 技术只能分析 OBP 在不同组织中的表达情况,但不能分析 OBP 在单个触角中的分布状况,而原位杂交技术通过制备能进入细胞的核酸探针,与细胞中待检测的核酸按碱基配对原则进行特异性结合,然后通过免疫组化方法在被检测的核酸原位形成颜色的杂交信号,在显微镜或电子显微镜下对被检测核酸进行细胞内定位。因此,该技术常用来分析单个或多个气味受体或气味结合蛋白在触角感受器中的分布状况和相互定位的空间关系(Nakagawa *et al*., 2005; Mitsuno *et al*., 2008),在嗅觉分子生物学研究中具有特殊地位。本研究在已知斜纹夜蛾 GOBP1 cDNA 序列(钟国华等,2008)的基础上,用 RT-PCR、克隆和 RNA 原位杂交技术等方法进一步分析了 GOBP1 的组织表达情况和 GOBP1 mRNA 在触角中的空间表达定位。

1　材料和方法

1.1　供试昆虫

斜纹夜蛾为室内人工饲料饲养,饲养温度为 26 ±2℃,光周期 14L: 10D。成虫羽化后 1 - 2 d 分别将雌雄斜纹夜蛾的触角、头部、足部、翅膀、胸部和腹部等组织分离,立即投放于液氮中冷冻,保存备用。

1.2　主要试剂与仪器

TRIzol 和 DNase Ⅰ 试剂为 Invitrogen 公司产品;RT-PCR 第一链 cDNA 合成试剂购于上海申能博采生物公司;2 × Taq master mix 购于北京天能生物技术公司;pGEM-T easy vector 为 Promega 公司产品;DNA 胶回收试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒为 TaKaRa 公司产品;地高辛转录标记试剂盒、Anti-dig-AP 抗体为 Roche 公司产品;NBT/BCIP 显色液购置上海生工。其他试剂为 AR 级产品。引物由上海捷瑞生物公司合成,测序由上海英骏测序公司完成。紫外核酸分析仪为日立 U-0080D,PCR 仪为德国 Eppendorf Mastercycler 梯度 PCR。

1.3　GOBP1 组织表达分析

GOBP1 组织特异性表达情况分析采用半定量 RT-PCR 方法,即从斜纹夜蛾不同组织提取的总 RNA 合成的第一链 cDNA 为模板,利用特异引物扩增 GOBP1,实验中以斜纹夜蛾 *actin* 作表达参照基因。实验重复 3 次。

1.3.1　引物设计:根据斜纹夜蛾 GOBP1 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号 EF159978),跨内含子设计并合成引物,正向引物开始于 cDNA 第 13 个碱基,加入 *Xba* Ⅰ酶切位点:5′-CGTCTAGACCGCCATGTTGTTGCTGTTGT-3′,反向

引物开始于第693个碱基,加入酶切位点 *Cla* Ⅰ:5′-GCATCGATATCGGCTGCCGTATTCTT-3′。

根据斜纹夜蛾 Actin 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号:DQ494753)设计合成引物,正向引物开始于第31个碱基:5′-GCCAACAGGGAGAAGATG-3′,反向引物开始于第301个碱基:5′-GGGTGGTGGTGAAAGAGTA-3′。

1.3.2 不同组织总 RNA 抽提及 RT-PCR:取保存于液氮中的不同组织 50 mg,用 TRIzol 试剂进行总 RNA 提取,所有操作按试剂盒说明书进行。最后将 RNA 溶于 25 μL 无 RNA 酶的 ddH_2O 中,取 2 μL 用紫外核酸分析仪进行 RNA 质量和浓度的初步检测,-75℃保存备用。

取 1 μg 总 RNA 和 Oligo $(dt)_{18}$(0.1 μg/μL) 2 μL, RNase inhibitor 0.5 μL,加入无 RNA 酶的 ddH_2O 使总体积为10.5 μL,轻柔混匀于 PCR 管中,置65℃保温10 min,再依次加入 5×Firstand buffer 4 μL,dNTP mix(10 mmol/L)2 μL,RNase inhibitor 0.5 μL,DTT(100 mmol/L)2 μL,M-MLV 反转录酶(200 U/μL)1 μL,37℃ 60 min,95℃ 5 min,立即转移置冰上冷却。管中即为合成的第一链 cDNA,-20℃保存备用。

PCR 反应体系为25 μL,配置如下:2 μL 第一链 cDNA、正反向引物(10 μmol/L)各 1 μL、2×Taq master mix 12.5 μL,ddH_2O 补至25 μL;PCR 反应条件:94℃ 3 min,之后进行28个循环的94℃ 15 s,56℃ 20 s,72℃ 30 s;最后72℃ 10 min。PCR 产物用1.4%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 RT-PCR 条带克隆及酶切、测序鉴定:PCR 产物电泳条带经 TaKaRa 凝胶回收试剂盒回收,克隆于 pGEM-T easy 载体上(按试剂盒说明操作),经蓝白斑筛选,取若干个阳性克隆质粒用 *Cla* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切鉴定,并送上海英骏公司测序。

1.4 GOBP1 转录 RNA 的定位分析

1.4.1 地高辛标记的 GOBP1 cRNA 探针制备:准备上步经测序的 pGEM-T-Easy-GOBP1 阳性克隆质粒。用 *Cla* Ⅰ、*Xba* Ⅰ分别酶切质粒,TaKaRa DNA 片段纯化试剂盒纯化线性 DNA。以线性质粒 pGEM-T-Easy-GOBP1/*Xba* Ⅰ为模板,SP6 RNA 聚合酶催化合成反义链 dig RNA 探针;以线性质粒 pGEM-T-Easy-GOBP1/*Cla* Ⅰ为模板,T7 RNA 聚合酶催化合成正义链 dig RNA 探针。

1.4.2 触角切片制备及预处理:从液氮中取出触角,用 OCT 包埋,12 μm 冰冻切片。空气干燥30 min。用4%多聚甲醛,4℃固定30 min。磷酸盐缓冲液洗 1 min;0.2 μmol/L 盐酸孵育 10 min;含1% Tritonx-100 的磷酸盐缓冲液冲洗 2 min;磷酸盐缓冲液冲洗 0.5 min,2 次;50%去离子甲酰胺,5×SSC 缓冲液冲洗10 min;晾干切片。

1.4.3 原位杂交程序:用杂交液稀释地高辛标记的 RNA 探针至 5 ng/100 μL,80℃变性 5 min,每张切片滴加 100 μL 稀释的探针,盖上盖片,放入底层有50%去离子甲酰胺的湿盒中,于55℃孵育箱中杂交过夜。次日,用0.1×SSC 缓冲液于60℃下冲洗2次,每次15 min。

1.4.4 免疫显色:用 TBS 配制的1%灭活山羊血清,内含 0.03% TritonX-100 室温下封闭切片30 min。加入碱性磷酸酶-地高辛抗体(1:500)稀释。每张切片滴加 100 μL 稀释后的抗体,盖上盖片,室温孵育30 min。用含0.05% Tween 的 TBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 5 min,DAP 缓冲液洗 10 min。每张切片滴加 200 μL NBT/BCIP 显色液,置湿盒中,室温避光过夜16 h。次日,用 Tris-EDTA 缓冲液冲洗切片5 min,终止显色反应。去离子水冲洗切片5 min,自然晾干。

实验中的正义探针组即为阴性对照。实验重复2次。

2 结果与分析

2.1 GOBP1 的组织表达分析

昆虫气味结合蛋白一般位于其嗅觉器官触角中。本文通过半定量 RT-PCR 技术,以持家基因 *actin* 为内参,鉴定了 GOBP1 在不同组织中的表达情况。发现斜纹夜蛾的 GOBP1 仅在触角中表达,其他组织中未见表达。雌雄两性中 GOBP1 的组织特异性表达情况类似,而且条带大小与预期697 bp 符合,其他组织均无此带(图1和图2),说明 GOBP1 是触角特异性表达的基因。另外,在图1中不同组织的样本在约900 bp 附近都出现了不同亮度的条带,推测是由于各组织样本在抽提总 RNA 过程中不同程度被基因组污染所致,而实验中 GOBP1 引物为跨内含子(164 bp)设计,能以基因组为模板进行扩增,其产物理论大小为860 bp。图2中各组织在900 bp 处均无条带出现,这是由于各样本在提取总 RNA 后都经 DNase Ⅰ处理,再继续 RT-PCR,这也证实了图1的860 bp 条带是由于提取的总 RNA 被基因组污染所致。

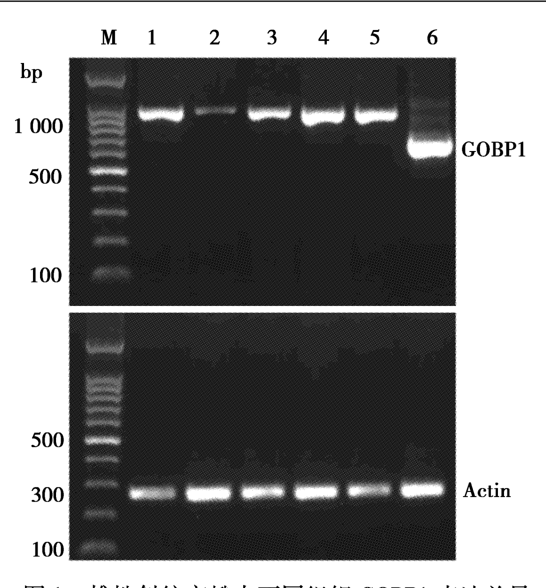


图 1　雄性斜纹夜蛾中不同组织 GOBP1 表达差异

Fig. 1　Expression of GOBP1 of tissues from male *Spodoptera litura* by RT-PCR, total RNA were not treated with DNase I

M: DNA 标准分子量 DNA molecular weight marker; 1: 头 Head; 2: 足 Leg; 3: 胸 Thorax; 4: 腹 Abdomen; 5: 翅 Wing; 6: 触角 Antenna. 图 2 同 The same for Fig. 2.

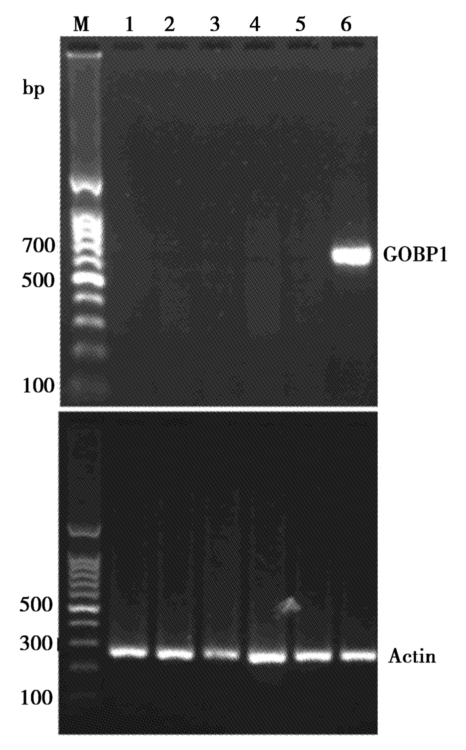


图 2　雌性斜纹夜蛾中不同组织 GOBP1 表达差异

Fig. 2　Expression of GOBP1 of tissues from female *Spodoptera litura*by RT-PCR, total RNA were treated with DNase I

2.2　GOBP1 扩增产物的克隆及鉴定

从触角组织 RT-PCR 扩增出的特异性条带经胶回收、与 pGEM-T easy 载体连接,转化 DH5α, 挑取若干阳性克隆菌经液体培养基扩增培养,抽提质粒。用 *Xba* Ⅰ和 *Cla* Ⅰ双酶切鉴定,电泳结果显示两条带,一条在 3 000 bp 位置,与 pGEM-T easy 空载体实际大小 3 015 bp 吻合,另一条在近 700 bp 处,大小与 GOBP1 cDNA 扩增片段大小 697 bp 符合(图 3)。

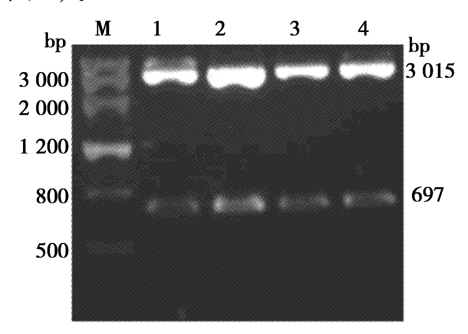


图 3　pGEM-T-GOBP1 重组质粒的 *Xba* Ⅰ和 *Cla* Ⅰ双酶切电泳图

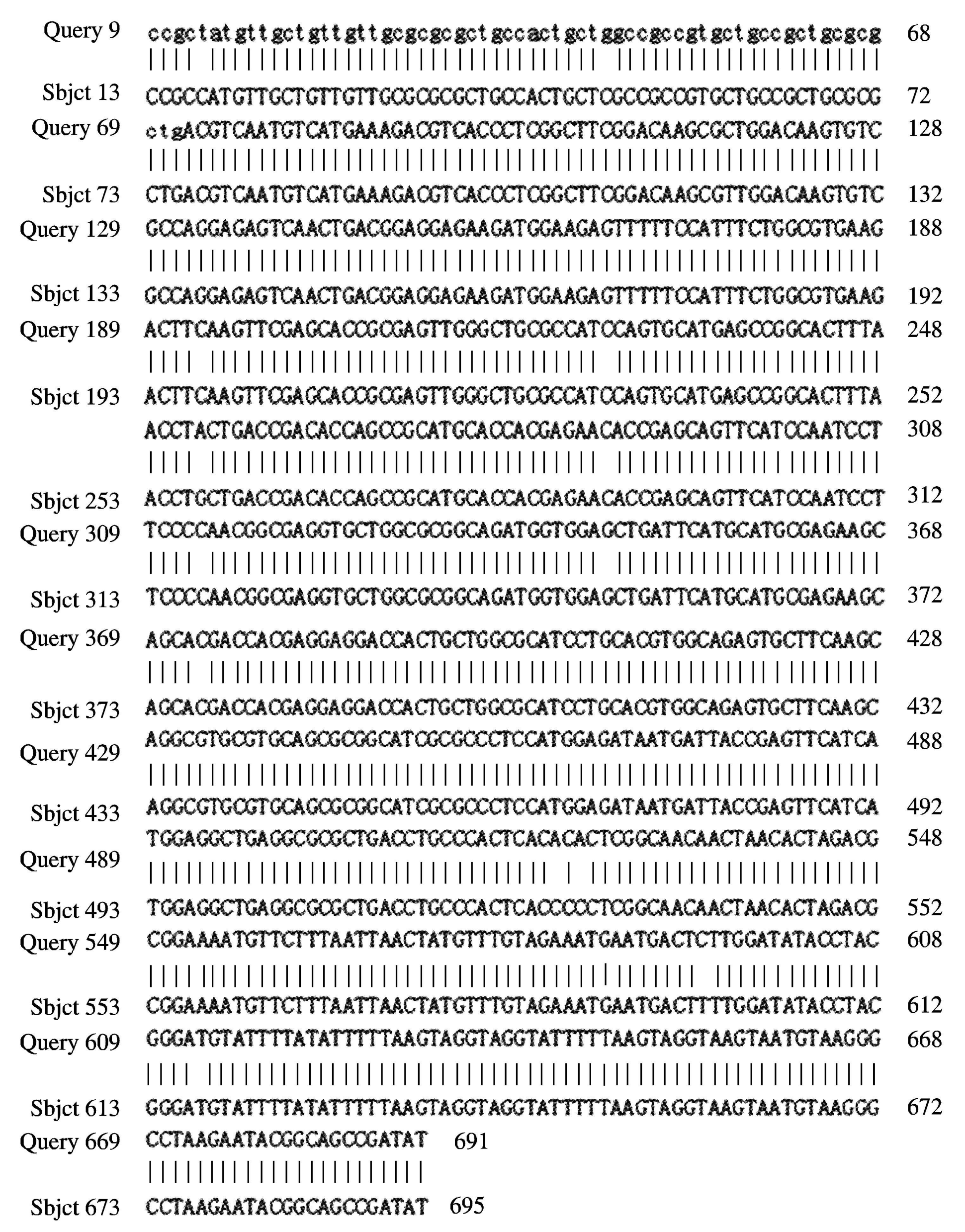
Fig. 3　pGEM-T-GOBP1 cleaved with the restriction enzyme *Xba* Ⅰ and *Cla* Ⅰ

M: DNA 标准分子量 DNA molecular weight marker; 1 –4: pGEM-T-GOBP1 重组质粒 The constructed pGEM-T-GOBP1.

取经酶切鉴定的质粒测序,并经 GenBank 中的 BLAST 检验,与斜纹夜蛾 GOBP1 cDNA 序列相似达 98%(图 4)。

2.3　GOBP1 mRNA 在触角中的表达定位

昆虫气味结合蛋白一般位于触角表皮的特化嗅觉感受器内的细胞周质中。因此,GOBP1 的转录本因较多分布于靠近含有嗅觉感受器的触角边缘区域。本实验中采用地高辛标记体外合成 GOBP1 cRNA,与触角切片原位杂交,抗体采用带碱性磷酸酶的抗地高辛抗体,用 NBT/BCIP 显色,杂交信号为淡蓝色颗粒沉积,杂交信号强处即为 GOBP1 转录本较多区域。从实验结果(图 5)可见用反义探针杂交后的切片中在触角边缘区域有明显的淡蓝色颗粒沉积,而用正义探针杂交后切片中未显示杂交信号或很弱,几乎未见淡蓝色颗粒沉积。这与理论相符合。

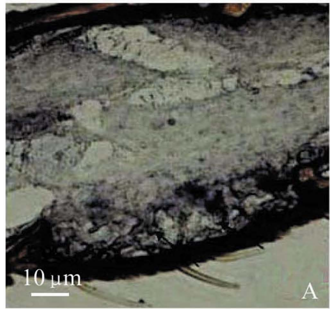


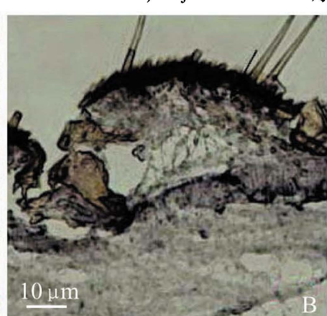
```
Query 9    ccgctatgttgctgttgttgcgcgcgctgccactgctggccgccgtgctgccgctgcgcg  68
           |||| |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct 13   CCGCCATGTTGCTGTTGTTGCGCGCGCTGCCACTGCTCGCCGCCGTGCTGCCGCTGCGCG  72
Query 69   ctgACGTCAATGTCATGAAAGACGTCACCCTCGGCTTCGGACAAGCGCTGGACAAGTGTC  128
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 73   CTGACGTCAATGTCATGAAAGACGTCACCCTCGGCTTCGGACAAGCGTTGGACAAGTGTC  132
Query 129  GCCAGGAGAGTCAACTGACGGAGGAGAAGATGGAAGAGTTTTTCCATTTCTGGCGTGAAG  188
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 133  GCCAGGAGAGTCAACTGACGGAGGAGAAGATGGAAGAGTTTTTCCATTTCTGGCGTGAAG  192
Query 189  ACTTCAAGTTCGAGCACCGCGAGTTGGGCTGCGCCATCCAGTGCATGAGCCGGCACTTTA  248
           |||| |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct 193  ACTTCAAGTTCGAGCACCGCGAGTTGGGCTGCGCCATCCAGTGCATGAGCCGGCACTTTA  252
           ACCTACTGACCGACACCAGCCGCATGCACCACGAGAACACCGAGCAGTTCATCCAATCCT  308
           |||| |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct 253  ACCTGCTGACCGACACCAGCCGCATGCACCACGAGAACACCGAGCAGTTCATCCAATCCT  312
Query 309  TCCCCAACGGCGAGGTGCTGGCGCGGCAGATGGTGGAGCTGATTCATGCATGCGAGAAGC  368
           |||| |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct 313  TCCCCAACGGCGAGGTGCTGGCGCGGCAGATGGTGGAGCTGATTCATGCATGCGAGAAGC  372
Query 369  AGCACGACCACGAGGAGGACCACTGCTGGCGCATCCTGCACGTGGCAGAGTGCTTCAAGC  428
           |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 373  AGCACGACCACGAGGAGGACCACTGCTGGCGCATCCTGCACGTGGCAGAGTGCTTCAAGC  432
           AGGCGTGCGTGCAGCGCGGCATCGCGCCCTCCATGGAGATAATGATTACCGAGTTCATCA  488
Query 429  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 433  AGGCGTGCGTGCAGCGCGGCATCGCGCCCTCCATGGAGATAATGATTACCGAGTTCATCA  492
           TGGAGGCTGAGGCGCGCTGACCTGCCCACTCACACACTCGGCAACAACTAACACTAGACG  548
Query 489  ||||||||||||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||
Sbjct 493  TGGAGGCTGAGGCGCGCTGACCTGCCCACTCACCCCCTCGGCAACAACTAACACTAGACG  552
Query 549  CGGAAAATGTTCTTTAATTAACTATGTTTGTAGAAATGAATGACTCTTGGATATACCTAC  608
           |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||
Sbjct 553  CGGAAAATGTTCTTTAATTAACTATGTTTGTAGAAATGAATGACTTTTGGATATACCTAC  612
Query 609  GGGATGTATTTTATATTTTTAAGTAGGTAGGTATTTTTAAGTAGGTAAGTAATGTAAGGG  668
           |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 613  GGGATGTATTTTATATTTTTAAGTAGGTAGGTATTTTTAAGTAGGTAAGTAATGTAAGGG  672
Query 669  CCTAAGAATACGGCAGCCGATAT  691
           |||||||||||||||||||||||
Sbjct 673  CCTAAGAATACGGCAGCCGATAT  695
```

图 4　GOBP1 的克隆测序结果作 BLAST 检验图

Fig. 4　BLAST results of cloned and sequenced GOBP1 in *Spodoptera litura*

Query：测序序列 Sequence here determined；Sbjct：EF159978 序列 Sequence of EF159978.





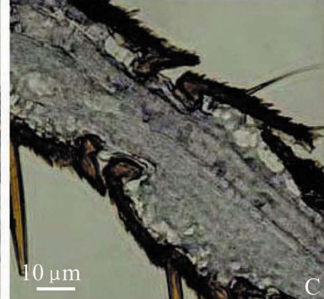


图 5　斜纹夜蛾中触角 GOBP1 的 RNA 原位杂交图，

Fig. 5　RNA *in situ* hybridization of GOBP1 in *Spodoptera litura* antenna

A 和 B 是反义探针杂交结果，C 是正义探针杂交结果。箭头所指为阳性杂交信号。全部杂交实验用抗地高平抗体标记，NBT/BCIP 显色。A，B：ISH with dig-cRNA GOBP1 antisense probe in *Spodoptera litura* antenna；C：ISH with dig-cRNA GOBP1 sense probe in *S. litura* antenna. The arrow indicated the hybridization signal. All were detected by anti-dig-AP and NBT/BCIP.

3 讨论

在参与气味分子识别的蛋白和酶类中,气味结合蛋白最为丰富。气味结合蛋白识别和结合外界气味分子是昆虫感受外界气味分子的第一步生化反应,是昆虫嗅觉信号传导链中的重要组成成份,气味结合蛋白的空间表达型与功能有着密切的关系。钟国华等(2008)已报道了斜纹夜蛾中 GOBP1 基因的全长 cDNA 编码序列,并对预测编码的氨基酸进行了分析,具有昆虫 GOBP1 的典型特征。本文通过 RT-PCR 和 RNA 原位杂交方法进一步分析了 GOBP1 的组织特异性表达情况和 GOBP Ⅰ 转录本定位情况,发现 GOBP1 仅在触角组织中表达,且其转录本较多分布于含有嗅觉感受器的触角边缘区域,这些结果都符合 GOBP1 的特性,进一步验证了该基因是属于气味结合蛋白的基因,是斜纹夜蛾嗅觉神经反应过程中的重要蛋白,而且本文建立的试验方法为研究其他嗅觉相关蛋白基因,如 PBP 和嗅觉受体基因等提供了参考价值。

另外,Steinbrecht 等(1995)和 Zhang 等(2001)用多克隆抗体细胞免疫技术分析 GOBP1 和 GOBP2 蛋白在有关蛾类中的分布情况,发现两者较显著地分布于触角的锥形感器中。而本实验应用原位杂交技术发现斜纹夜蛾 GOBP1 较多分布于触角边缘区域,未能辨别 GOBP1 在不同类型感受器中分布量的差异,而这是否与不同物种,不同 GOBP1 有关,或者是否由于实验中设计的 GOBP1 标记探针特异性欠佳,导致杂交敏感性降低所致有关,有待用其他方法如制备 GOBP1 多克隆抗体血清应用细胞免疫技术等方法进一步验证 GOBP1 的定位情况。此外,对本文的 GOBP1 蛋白结合气味的运载功能还待进一步研究,我们正在进行基因的重组表达和纯化,有望获得晶体,从而进行进一步的功能研究。这些结果将对深入揭示斜纹夜蛾对外界气味的分子识别机制提供基础,不仅有利于阐明昆虫嗅觉反应的本质原因,而且为研究无脊椎和脊椎动物的嗅觉行为提供了理想模型,也有利于研究人的嗅觉机制(Matarazzo *et al.*, 2002)。

参 考 文 献(References)

Field LM, Pickett JA, Wadhams LJ, 2000. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Mol. Biol.*, 9(6): 545 – 551.

Gong ZJ, Yuan GH, Guo XR, AN SH, 2005. Cloning and sequencing of cDNA encoding general odorant binding protein II in the antenna of *Helicoverpa assulta* and its expression in *Escherichia coli*. *Acta Entomologica Sinica*, 48(1): 18 – 23.[巩中军,原国辉,郭线茹,安世恒,2005. 烟实夜蛾触角普通气味结合蛋白 II cDNA 的克隆、序列分析及在大肠杆菌中的表达. 昆虫学报,48(1): 18 – 23]

Konstantopoulou MA, Pratsinis H, Kletsas D, Mazomenos BE, 2006. Pheromone-binding protein and general odorant binding protein of *Sesamia nonagrioides*: Sex and diel-dependent expression. *Entomol. Exp. Appl.*, 119(2): 129 – 136.

Krieger J, Breer H, 1999. Olfactory reception in invertebrates. *Science*, 286(5 440): 720 – 723.

Kruse SW, Zhao R, Smith DP, Jones DNM, 2003. Structure of a specific alcohol-binding site defined by the odorant binding protein LUSH from *Drosophila melanogaster*. *Nature Structural Biology*, 10: 694 – 700.

Li F, Prestwich GD, 1997. Expression and characterization of a lepidopteran general odorant binding protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(5): 405 – 412.

Li ZX, Zhou JJ, 2004. Cloning, identification and expression profiling of the cDNAs of odorant-binding proteins in the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Acta Entomologica Sinica*, 47(4): 417 – 423.[李正西,Zhou JJ, 2004. 冈比亚按蚊嗅觉结合蛋白候选基因 cDNA 的克隆、鉴定及其表达型分析. 昆虫学报, 47(4): 417 – 423]

Maida R, Krieger J, Gebauer T, Lange U, Ziegelberger G, 2000. Three pheromone-binding proteins in olfactory sensilla of the two silkmoth species *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi*. *European Journal of Biochemistry*, 267: 2 899 – 2 908.

Maida R, Ziegelberger G, Kaissling KE, 2003. Ligand binding to six recombinant pheromone-binding proteins of *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi*. *J. Comp. Physiol. B*, 173: 565 – 573.

Matarazzo V, Zsurger N, Guillemot JC, Clot-Faybesse O, Botto JM, Farra CD, Crowe M, Demaille J, Vincent JP, Mazella J, Ronin C, 2002. Porcine odorant-binding protein selectively binds to a human olfactory receptor. *Chem. Senses*, 27: 691 – 701.

Mitsuno H, Sakurai T, Murai M, Yasuda T, Kugimiya S, Ozawa R, Toyohara H, Takabayashi J, Miyoshi H, Nishioka T, 2008. Identification of receptors of main sex-pheromone components of three Lepidopteran species. *Eur. J. Neuroscience*, 28: 893 – 902.

Nakagawa T, Sakurai T, Nishioka T, Touhara K, 2005. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science*, 307 (5 715): 1 638 – 1 642.

Steinbrecht RA, Laue M, Ziegelberger G, 1995. Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Res.*, 282: 203 – 217.

Vogt RG, 2005. Molecular basis of pheromone detection in insects. In: LI Gilbert, Iatro K, Gill S eds. Comprehensive Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology. Vol. 3. Endocrinology. Elsevier Academic Press, London. 753 – 804.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161 – 163.

Wang GR, Guo YY, Xu G, Wu KM, 2001. Cloning and sequencing of a gene encoding GOBP2 in the antenna of *Spodoptera exigua*. *Scientia Agricultura Sinica*, 34(6): 619 – 625. [王桂荣,郭予元,徐广,吴孔明,2001. 甜菜夜蛾 GOBP2 基因的克隆及序列测定. 中国农业科学, 34(6): 619 – 625]

Wang P, Lyman RF, Shabalina SA, Mackay TFC, Anholt RRH, 2007. Association of polymorphisms in odorant-binding protein genes with variation in olfactory response to benzaldehyde in *Drosophila*. *Genetics*, 177(3): 1 655 – 1 665.

Wojtasek H, Leal WS, 2005. Conformational change in the pheromone binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes. *J. Biol. Chem.*, 274: 30 950 – 30 956.

Xie JJ, Hu MY, Xu ZF, 1999. Natural enemies of *Spodoptera litura* and their use in biological control. *Natural Enemies of Insects*, 21(2): 82 – 92. [谢建军,胡美英,许再福, 1999. 斜纹夜蛾的天敌及其生物防治. 昆虫天敌,21(2): 82 – 92]

Xiu WM, Zhou YZ, Dong SL, 2008. Molecular characterization and expression pattern of two pheromone-binding proteins from *Spodoptera litura* (Fabricius). *J. Chem. Ecol.*, 34: 487 – 498.

Zhang S, Maida R, Steinbrecht RA, 2001. Immunolocalization of odorant-binding proteins in noctuid moths (Insecta, Lepidoptera). *Chem. Senses*, 26(7): 885 – 896.

Zhong GH, Li MM, Hu MY, Luo Q, Ma JL, 2008. Cloing and sequence analysis of *Slit*GOBP1 encoding a general odorant binding protein 1 from *Spodoptera litura*. *Journal of South China Agricultural University*, 29(2): 38 – 43. [钟国华,李苗孟,胡美英,罗倩,马金亮,2008. 斜纹夜蛾普通气味结合蛋白基因 *Slit*GOBP1 的克隆及序列分析. 华南农业大学学报,29(2): 38 – 43]

(责任编辑:邓艳)